บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น D-0601 model 500 บริษัท Memmert, U.S.A.
- ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) บริษัท International Scientific supply Co.Ltd., Thailand.
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (Controlled environment incubator shaker) รุ่น R-88 บริษัท New Brunswick Scientific Co.Ltd., U.S.A.
- เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) model HERTZ บริษัท Kubota Corporation, Japan.
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Aquatherm G-86 บริษัท New Brunswick Scientific Co.Ltd., U.S.A.
- เครื่องผสมสาร (vortex) รุ่น vortex-2 Genie model G-560E บริษัท Scientific Industries., U.S.A.
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) รุ่น Cyberscan 1000 บริษัท Eutech Cyberscan, Singapore.
- เครื่องชั่งน้ำหนัก รุ่น A200S บริษัท Sartorius, Germany.
- แผ่นกรองชนิดเซลลูโลสอะซิเตต (cellulose acetate filter) Pore size 0.45 μM บริษัท Sartorius, Germany.
- หลอดฉีดยา (syringe) ขนาด 10 มิลลิลิตร บริษัท Nipro, Thailand.
- ฮีมาซัยโตมิเตอร์ (haemacytometer) ขนาด bright line deep 1/10 มิลลิลิตร บริษัท Boeco, West Germany.
- กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope) รุ่น SZH-10 บริษัท Olympus Optical Co.Ltd., Japan.
- กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CHS บริษัท Olympus Optical Co.Ltd., Japan.
- กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope) รุ่น JEOL model JEM-200CX , Japan.
- Swinnex Filter Unit บริษัท Millipore Corporation, USA.

3.2 สารเคมี

- กรดฮิวมิค (humic acid) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ไบโอติน (biotin) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ไทอามิน-ไฮโดรคลอไรด์ (Thiamine-HCl) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ไรโบเฟลวิน (riboflavin) บริษัท Merck, Germany.
- ไนอะซิน (niacin) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ไพริดอกซิน- ไฮโดรคลอไรด์ (pyridoxin-HCl) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิค (p-aminobenzoic acid) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- แมนนิทอล (mannitol) บริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- โพลีเอธิลีนไกลคอล (polyethyleneglycol) บริษัท Sigma chemical, U.S.A.
- ยูรานิลอะซิเตต (uranyl acetate) บริษัท Fluka Chemika, Switzerland.

3.3 จุลินทรีย์

3.3.1 สเตรปโตมัยซิทีส

1. *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* JCM 4772, NOV-1
2. *S. coerulescens* ISP 5146
3. *S. coralus* JCM 4313
4. *S. ambofaciens* JCM 4618
5. *S. violacoechromogenes* JCM 4530
6. *S. tauricus* JCM 4837
7. *S. melanosporofaciens* JCM 4495
8. *S. pavullus* F4b-31
9. *S. perciperlis* V6C-6
10. *S. griseus* KA-1198
11. *S. luteogriseus* ISP 5483
12. *S. alboniger* ATCC 12461
13. *S. albovinaceus* ATCC 15823
14. *S. aminophilus* ATCC 14961

15. *Streptomyces* sp. PO
16. *Streptomyces* sp. M145
17. *Streptomyces* sp. PK100C
18. *Streptomyces* sp. TK21

สายพันธุ์ที่ 1-11 ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ
สายพันธุ์ที่ 12-14 ซื้อมาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
สายพันธุ์ที่ 15-18 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Ogata Seiya

3.3.2 <u>จุลินทรีย์สำหรับทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ</u> (Test organisms)

Staphylococcus aureus ATCC 25923
Escherichia coli ATCC 25922
Micrococcus luteus ATCC 9341
Bacillus subtilis ATCC 6633
Candida albicans ATCC 70014
Saccharomyces cerevisiae
Aspergillus niger ATCC 6275
Pseudomonas fluorescens K. Komagata

ที่มา : ซื้อมาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.4 การเก็บจุลินทรีย์

3.4.1 <u>การเตรียมและเก็บรักษาสปอร์ของสเตรปโตมัยซีทีส</u>

ขีด (streak) สปอร์หรือมัยซิเลียมของเชื้อลงบนอาหารวุ้นเอียงแมนนิทอล มังบีน อการ์ (Mannitol Mungbean Agar : เอ็มเอ็ม อการ์ (MM agar) ; ภาคผนวก ก หมายเลข 1) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 7-14 วัน เติมสารละลาย 20 เปอร์เซนต์ กลีเซอรอล (20% glycerol (ปริมาตรต่อปริมาตร)) 10 มิลลิลิตร ใช้ลูป (loop) ขูดให้สปอร์หลุด กรองสปอร์แขวนลอยในสารละลายกลีเซอรอลด้วยสำลีปลอดเชื้อ เก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

3.4.2 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ

เขี่ยเชื้อ *B. subtilis, S. aureus, E. coli, Ps. fluorescens* และ *M. luteus* ลงบนอาหารวุ้นเอียงนิวเตรียนท์ อการ์ (Nutrient Agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 2) และเขี่ยเชื้อ *S. cerevisiae* และ *C.albicans* ลงบนอาหารวุ้นเอียงวายเอ็ม (Yeast Malt extract Agar : YM agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 5) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เขี่ยเชื้อ *A. niger* ลงบนอาหารวุ้นเอียงพีดีเอ (Potato Dextrose Agar : PDA agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 6) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 3-4 วัน

เมื่อเชื้อทั้งหมดเจริญดีแล้ว เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารที่ใหม่ เพื่อเก็บรักษาทุกๆ 1 เดือน โดยวิธีเดียวกัน

3.5 ตัวอย่างดิน

3.5.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากจังหวัดต่างๆของประเทศไทย ประมาณ 30-100 กรัม โดยเก็บลึกจากผิวดินประมาณ 7-10 เซนติเมตร บันทึกสถานที่เก็บ ลักษณะและสีของดิน นำมาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5.2 การวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน

ชั่งตัวอย่างดิน 5 กรัม เติมน้ำกลั่นค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ตั้งสารแขวนลอยดินให้ตกตะกอน นำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Lanning and Williams, 1982)

3.6 การแยกสเตรปโตมัยซีทีสจากตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดิน 1 กรัม มาเจือจางในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร เจือจางสารแขวนลอยดินให้มีค่าลดลงระดับละสิบเท่า (serial ten fold dilution) ประมาณห้าระดับ (10^{-1}-10^{-5}) และนำสารแขวนลอยดินแต่ละระดับการเจือจางไปแช่ในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

นำสารแขวนลอยดิน 0.1 มิลลิลิตร สเปรด (spread) บนอาหารฮิวมิค แอซิด วิตามิน อการ์ (Humic acid Vitamin agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 7) (Hayakawa and Nonomura, 1987) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน เมื่อเชื้อเจริญดีแล้วโดยโคโลนีจะ

มีลักษณะเป็นเส้นใยขนาดเล็กบนผิวหน้าอาหารวุ้น ทำการถ่ายเชื้อมาขีดลงบนอาหารเอ็มเอ็ม อการ์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ต่อไป

3.7 การเตรียมสปอร์แขวนลอย

ขีดสเตรปโตมัยซิทีสจากข้อ 3.6 ลงบนอาหารวุ้นเอียงเอ็มเอ็ม อการ์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน เมื่อเชื้อเจริญจนมีสปอร์มากพอ เติมสารละลาย 20 เปอร์เซนต์ กลีเซอรอล 10 มิลลิลิตรลงไป ใช้ลูปเขี่ยสปอร์ให้หลุดเป็นสปอร์แขวนลอย แล้วนำไปกรองด้วยสำลีปลอดเชื้อ ปรับจำนวนสปอร์ให้ได้ประมาณ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยการนับด้วยฮีมาซัยโตมิเตอร์ เก็บรักษาสปอร์แขวนลอยที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

3.8 การศึกษาลักษณะของเชื้อสเตรปโตมัยซิทีสที่แยกได้จากดิน

ศึกษาตามวิธีที่รายงานโดย Williams และคณะ (1983) และ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology volume 4. (Williams et al., 1989)

3.8.1 ศึกษาสีของโคโลนีและสปอร์

ขีดเชื้อสเตรปโตมัยซิทีสลงบนอาหารอินออร์แกนิค ซอล์ท สตาร์ช อการ์ (Inorganic Salt Starch Agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 8) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน สังเกตสีของโคโลนีและสปอร์ที่เกิดขึ้น

3.8.2 ศึกษาลักษณะของมัยซิเลียมและการเรียงตัวของสปอร์

นำเชื้อสเตรปโตมัยซิทีสมาเพาะเลี้ยงโดยวิธีการทำสไลด์คัลเจอร์ (slide culture) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน นำมาย้อมด้วยแลคโตฟีนอล (lactophenol) ศึกษาลักษณะของมัยซิเลียม การเรียงตัวของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

3.8.3 ศึกษาการสร้างรงควัตถุเมลานิน (melanin pigment)

ขีดเชื้อสเตรปโตมัยซิทีสลงบนอาหารวุ้นเอียงเปปโตน ยีสต์เอกซ์แทรก ไอออน อการ์ (Peptone Yeast extract Ion Agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 9) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ตรวจดูการสร้างรงควัตถุเมื่อเข้าสู่วันที่ 4 โดยจะเกิดสีดำหรือสีน้ำตาลเข้มในอาหารวุ้นเอียง

3.8.4 ศึกษาการสร้างรงควัตถุที่สามารถแพร่กระจายได้ (diffusible pigment)

ขีดเชื้อสเตรปโตมัยซิทีสลงบนอาหารวุ้นเอียงกลีเซอรอล-แอสปาราจีน อการ์ (Glycerol-Asparagine Agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 10) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7-14 วัน โดยจะเกิดสีบนอาหารวุ้นเอียง คือ เหลือง-น้ำตาล น้ำเงิน เขียว แดง-ส้ม และม่วง

3.8.5 ศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ

นำสปอร์แขวนลอยของสเตรปโตมัยซิทีสจากข้อ 3.7 มาทำการจุด (spot) ลงบนผิวหน้าอาหารนิวเตรียนท์ อการ์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำจุลินทรีย์ทดสอบที่ทำการเพาะเลี้ยงตามวิธีข้อ 3.4.2 มาเติมน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซนต์ (0.9% NaCl (น้ำหนักต่อปริมาตร)) ได้เป็นเซลล์แขวนลอย

นำเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละตัว ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมลงในสล็อปปี อการ์ (sloppy agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 4) ผสมให้เข้ากัน นำไปเททับลงบนเชื้อสเตปโตมัยซิทิสที่เจริญเป็นจุดบนนิวเตรียนท์ อการ์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบจากการเกิดบริเวณใส (clear zone) รอบเชื้อสเตรปโตมัยซิทีส

3.9 การแยกแอคติโนฟาจที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในสเตรปโตมัยซิทีสโดยวิธีการส่งเสริมการเจริญ (enrichment method)

นำตัวอย่างดิน 25 กรัม ใส่ในนิวเตรียนท์บรอท 50 มิลลิลิตรที่บรรจุในขวดทดลองรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และเติมสปอร์แขวนลอยของสเตรปโตมัยซิทีสที่แยกจากดินตัวอย่างเดียวกันนี้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกดินออกโดยนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใส (supernatant) ไปกรองผ่านแผ่นกรองเซลลูโลสอะซิเตตขนาด 0.45 ไมโครเมตร (Dowding, 1973)

3.10 ตรวจสอบการติดเชื้อของแอคติโนฟาจด้วยวิธีการทำอาหารวุ้นสองชั้น (double agar layer method)

นำส่วนน้ำใสที่ผ่านการกรองจากข้อ 3.9 เจือจางด้วยนิวเตรียนท์บรอท ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-5} จากนั้นนำส่วนน้ำใสแต่ละระดับความเข้มข้นปริมาตร 200 ไมโครลิตร และสปอร์แขวนลอยของสเตรปโตมัยซิทีสตัวเดียวกับที่ทำการแยกแอคติโนฟาจในข้อ 3.9 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมลงในสล็อปปีอการ์ ผสมให้เข้ากัน เทลงบนนิวเตรียนท์อการ์ที่เตรียมไว้ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตรวจสอบการติดเชื้อของแอคติโนฟาจกับสเตรปโตมัยซิทีสจากการเกิดพล๊าค (Dowding, 1973 ; Lanning and Williams, 1982 ; Anne et al.,1984)

3.11 การนำอนุภาคแอคติโนฟาจจากจานเพาะเชื้อที่เกิดการติดเชื้อ

นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่เกิดพล๊าคมาเติมนิวเตรียนท์บรอท ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าจานเพาะเลี้ยงเชื้อทุกๆ 15 นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำของเหลวจากจานเพาะเลี้ยงเชื้อนี้กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ได้เป็นแอคติโนฟาจแขวนลอย (actinophage suspensions) ตรวจสอบอนุภาคแอคติโนฟาจอิสระในแอคติโนฟาจแขวนลอยด้วยเทคนิคการทำอาหารวุ้นสองชั้นอีกครั้ง (Sykes et al., 1981)

3.12 การศึกษาความสามารถในการเกิดพล๊าค

ทำการเจือจางแอคติโนฟาจแขวนลอยจากข้อ 3.11 ด้วยนิวเตรียนท์บรอทให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-5} นำมาทำอาหารวุ้นสองชั้น ตรวจสอบขนาด ความขุ่น ลักษณะขอบของพล๊าคและนับจำนวนพล๊าค โดยการนับจำนวนพล๊าคจะนับในจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนพล๊าคเหมาะสม คืออยู่ระหว่าง 50-300 พล๊าคต่อจานเพาะเชื้อ (Dowding, 1973) นำจำนวนพล๊าคมาคำนวณหาค่าความสามารถในการเกิดพล๊าค จากสูตร (Luria et al., 1978)

$$\text{ความสามารถในการเกิดพล๊าค (p.f.u./ml)} = \frac{\text{จำนวนพล๊าค}}{\text{ปริมาตรแอคติโนฟาจที่ใช้ X ค่าอัตราการเจือจาง}}$$

I20608463

3.13 การเพิ่มปริมาณและการเก็บรวบรวมแอคติโนฟาจ

นำแอคติโนฟาจแขวนลอยที่ได้จากข้อ 3.12 ของระดับการเจือจางที่ให้พล๊าคปริมาณที่เหมาะสมมาทำอาหารวุ้นสองชั้น โดยเพิ่มปริมาณจานเพาะเลี้ยงเชื้อเป็น 15-20 จาน เมื่อเกิดพล๊าคแล้วทำการทดลองเหมือนข้อ 3.11 และกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บแอคติโนฟาจที่แขวนลอยในนิวเตรียนท์บรอทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.14 การศึกษาแอคติโนฟาจโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน

ทำการตกตะกอนแอคติโนฟาจแขวนลอยจากข้อ 3.13 ด้วยโซเดียมคลอไรด์และโพลีเอทธิลีนไกลคอล (ปรับปริมาตรทั้งหมดของสารละลายให้เป็น 0.5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์และ 10 เปอร์เซนต์โพลีเอทธิลีนไกลคอล) บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10000 x *g* เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลาย 0.1 โมลาร์แอมโมเนียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 (Ammonium acetate buffer ; ภาคผนวก ข)

หยดแอคติโนฟาจในสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตลงบนกริด (grid) และย้อมด้วยวิธีเนกาทีฟ สเตนนิ่ง (negative staining) โดยใช้ 2 เปอร์เซนต์ ยูรานิลอะซิเตต (uranyl acetate) จากนั้นนำไปศึกษารูปร่างอนุภาคแอคติโนฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (Dowding, 1973 ; Kuhn et al., 1987)

3.15 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอคติโนฟาจที่แยกได้จากสเตรปโตมัยซิทีสสายพันธุ์หนึ่งกับสเตรปโตมัยซิทีสอีกสายพันธุ์อื่น

นำสปอร์แขวนลอยของสเตรปโตมัยซิทีสสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินและสเตรปโตมัยซิทีสสายพันธุ์อ้างอิงที่ทราบชนิด แต่ละสายพันธุ์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มาใส่ในสล็อปปีอการ์ ผสมให้เข้ากันเทลงบนนิวเตรียนท์ อการ์ จากนั้นนำแอคติโนฟาจแขวนลอยแต่ละชนิดมาทดสอบการทำให้เกิดการติดเชื้อในโฮสท์เซลล์ ด้วยการหยดแอคติโนฟาจแขวนลอยปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงไปเป็นจุดลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตรวจสอบการติดเชื้อเบื้องต้นจากการเกิดบริเวณใสตรงบริเวณที่ทำการจุดแอคติโนฟาจแขวนลอยบนจานเพาะเชื้อ (Anne et al., 1984)

นำแอคติโนฟาจและสเตรปโตมัยซิทีสที่เกิดการติดเชื้อจากการตรวจสอบข้างต้นมาทำตามข้อ 3.1 ตรวจสอบลักษณะของพล๊าคที่เกิดขึ้น